

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-158963

(43)Date of publication of application : 22.06.1989

(51)Int.Cl.

A61L 27/00
C12N 5/00

(21)Application number : 62-317326

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 17.12.1987

(72)Inventor : KOIDE MIKIO
KONISHI ATSUSHI

(54) COLLAGEN MATRIX CONTAINING CELL GROWTH FACTOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To keep the effect of a cell growth factor, by containing a specific amount of the cell growth factor in a collagen matrix.

CONSTITUTION: As collagen used in a collagen matrix, atherocollagen is pref. The matrix means a substance having a lattice structure and, as a representative example, sponge is designated. Any cell growth factor capable of directly or indirectly promoting the proliferation of a surface cell being a skin cell and fibroblast is used without being especially limited, and insulin, hydrocortisone, an epithelial cell growth factor and urogastrone are suitably used. The cell growth factor is used in an amount of about 0.1Wbelow 10%, pref., 0.2W3% by wt. of the whole of the matrix. When the cell growth factor is below 0.1wt.%, the effect thereof is not developed. When the cell growth factor is added in an amount of 10wt.% or more, the proliferation of a cell is suppressed on the contrary.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

⑫ 公開特許公報(A)

平1-158963

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)6月22日

A 61 L 27/00
C 12 N 5/00C-6779-4C
E-8515-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 細胞増殖因子含有コラーゲンマトリックス

⑮ 特 願 昭62-317326

⑯ 出 願 昭62(1987)12月17日

⑰ 発 明 者 小 出 幹 夫 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
 ⑰ 発 明 者 小 西 淳 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
 ⑱ 出 願 人 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
 ⑲ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 細胞増殖因子含有コラーゲン
マトリックス

2. 特許請求の範囲

- 1) コラーゲンからなり、全重量の約0.1重量%以上10重量%未満の細胞増殖因子を含有するマトリックスからなることを特徴とするコラーゲンマトリックス。
- 2) コラーゲンがアテロコラーゲンである特許請求の範囲第1項に記載のコラーゲンマトリックス。
- 3) 細胞増殖因子が、インシュリン、ヒドロコルチゾン、上皮細胞成長因子(EGF)またはウロガストロンである特許請求の範囲第1項または第2項に記載のコラーゲンマトリックス。
- 4) 細胞増殖因子の含有比が、全体の0.2~3重量%である特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかの項に記載のコラーゲンマトリックス。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、コラーゲンマトリックスに関する。さらに詳しくは、本発明は、コラーゲンからなり、細胞増殖因子を含有するコラーゲンマトリックスに関する。

本発明のコラーゲンマトリックスは、生体適合性が高く免疫原性がない上、細胞増殖を促進するので、人工皮膚等の医用材料や細胞増殖用の培地として有用である。

[従来の技術およびその問題点]

近年、未変性コラーゲンの抗原性のほとんどを占めるテロペプチドをペプシン等の作用によって除去したアテロコラーゲンの応用が研究されており、アテロコラーゲンをコラーゲンマトリックスに用いることも報告されている。

一方、細胞増殖因子、例えばある種のホルモン、糖質コルチコイド、上皮細胞成長因子を細胞の培養系に適量加えると、細胞の増殖速度が著しく促進することが知られている。

BEST AVAILABLE COPY

しかし、上記因子を培地に加えた場合にはその効果に持続性がなく、一過性であるためときどき該因子の補給が必要であり、さらに培地の交換時ごとに新たに添加しなければならない不便さがあつた。本発明者らは、鋭意研究の結果この細胞増殖因子をコラーゲンのマトリックス中に含有させることによって、その効果を持続させ得ることを見出した。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は上記の知見に基づいて完成されたものであり以下の構成を有する。

- 1) コラーゲンからなり、全重量の約0.1重量%以上10重量%未満の細胞増殖因子を含有するマトリックスからなることを特徴とするコラーゲンマトリックス。
- 2) コラーゲンがアテロコラーゲンである第1項に記載のコラーゲンマトリックス。
- 3) 細胞増殖因子が、インシュリン、ハイドロコチゾン、上皮細胞成長因子(EGF)またはウロガストロンである第1項または第2項に

胞成長因子(EGF)、ウロガストロン、等が挙げられ、特にインシュリン、ハイドロコチゾン、上皮細胞成長因子(EGF)ウロガストロンは好適に用いられる。

インシュリンは、スイ臓中のランゲルハンス島のB細胞から分泌される、グロブリンに属するホルモン作用をもつタンパク質である。インシュリンは、いろいろな細胞種に対して、ゆっくりと働いて持続的に増殖能を支える作用を有する因子である。

ハイドロコチゾンは、糖新生作用のある副腎皮質ホルモンの1つであり、副腎皮質から単離され、コルチゾン、 17α -オキシ-11-デオキシコルチコステロンその他の化合物から合成されている。ハイドロコルチゾンは、細胞増殖抑制作用を有し(高濃度投与)、一方では、細胞増殖促進作用も有する(低濃度投与)ことが知られている。体中のほとんど全ての組織や細胞に対して、作用するホルモンである。従って抗炎症、抗アレルギー薬等としてのみならず、創傷の治療などにも

記載のコラーゲンマトリックス。

- 4) 細胞増殖因子の含有比が、全体の0.2~3重量%である第1項ないし第3項のいずれかの項に記載のコラーゲンマトリックス。

本発明のコラーゲンマトリックスに使用されるコラーゲンは、アテロコラーゲンが好適である。アテロコラーゲンは、コラーゲンのほとんどの抗原性を占めるテロペプチドがペプシン等のプロテアーゼによる加水分解によって除去されたものである。

アテロコラーゲンは、このようにテロペプチドが除去されているので、免疫原性がなくまた生体適合性も高い。

本発明において、マトリックスとは格子構造をもつ物質を意味し、代表例としては、スポンジなどがあげられる。

本発明で用いられる細胞増殖因子は、皮膚細胞である表皮細胞と線維芽細胞の増殖を直接的または間接的に促進しうるものであれば特に制限はなく、インシュリン、ハイドロコチゾン、上皮細胞

使用されている。

上皮細胞成長因子(EGF)は、マウス顎下腺より分離された、上皮細胞の増殖を促進する因子であり、マウスEGF(mEGF)は、53個のアミノ酸からなるペプチドである。皮膚、舌、食道等の上皮組織の細胞増殖と分化の促進などの作用を有している。

ウロガストロンは、ヒト尿中より単離されたヒト上皮細胞増殖因子のことであり、上記マウスEGFとは、53個のアミノ酸のうち16個を異にする。ウロガストロンは、胃液分泌抑制作用とともに細胞増殖作用を有しており、創傷治療薬としての用途が期待されている。

以上説明したように、インシュリン、ハイドロコチゾン等のホルモンは、細胞に対する種々の効果、特に細胞増殖効果が期待されている。なかでもハイドロコチゾンは、今や創傷治療における炎症抑制に欠かせない薬物とされている。

培養系におけるインシュリン及びハイドロコチゾンに対する増殖効果を第1図に示す。第1図

中、縦軸は細胞数を示し、横軸は培養時間を示す。
 -○-はヒドロコチゾン(Hc)とインシュリン(Ins)を添加しない場合を示し、-□-はInsのみを $10\mu\text{g/ml}$ 、-△-はHcのみを $10\mu\text{g/ml}$ 、-●-はHcを $1\mu\text{g/ml}$ 、Insを $10\mu\text{g/ml}$ 、-▲-はHcを $10\mu\text{g/ml}$ 、Insを $50\mu\text{g/ml}$ 、-■-はHcを $10\mu\text{g/ml}$ 、Insを $100\mu\text{g/ml}$ 添加した場合を各々示す。

なお、細胞増殖因子は、本発明のマトリックス中、全重量の約0.1~9重量%、好ましくは0.1~5重量%、より好ましくは0.2~3重量%の量で用いられる。これら細胞増殖因子は、0.1重量%未満ではその効果がほとんどない。10重量%以上の量を添加すると、却って細胞増殖を抑制することが知られている(江川による「日会誌」96(12), 1259~1273(1986))。

この細胞増殖因子は、本発明ではマトリックス中に組み込まれているので、高濃度で添加しなくても、また、使用中に追加しなくても、効果が持続する。

-40℃/0.1Torr 未満の真空下で凍結乾燥すると、ヒドロコチゾン含有のコラーゲンスポンジが得られた。

実施例 2

インシュリン含有のコラーゲンスポンジの調製
 アテロコラーゲン 1.0gをpH3.0の希塩酸溶液中に溶解して、アテロコラーゲンの濃度を0.3重量/容量%とした。この溶液を高速で攪拌しながら、40単位/mlの等張インシュリン水溶液を滴下した。このインシュリン溶液は、インシュリンの最終的含有比が各々0.25重量%、2.5重量%となるような量で加えた。

次に得られた各インシュリン含有アテロコラーゲン溶液を実施例1と同様に凍結乾燥したところ、インシュリン含有のコラーゲンスポンジが得られた。

実施例 3

ウロガストロン含有のコラーゲンスポンジの調製
 pH3.0の希塩酸に溶解させた0.3重量/容量%

本発明の細胞増殖因子含有コラーゲンマトリックスは、アテロコラーゲン溶液に細胞増殖因子を含む溶液を混合し、凍結乾燥することによって製造される。

以下本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例 1

ヒドロコチゾン含有のコラーゲンスポンジの調製

アテロコラーゲン 1.0gをpH3.0の希塩酸溶液中に溶解して、アテロコラーゲンの濃度を0.3重量/容量%とした。この溶液を高速で攪拌しながら、ヒドロコチゾンの0.5重量/容量%エタノール溶液をゆっくり滴下してさらに10分間程攪拌した。上記ヒドロコチゾン溶液は、ヒドロコチゾンの最終的な含有比が各々0.25重量%、2.5重量%、5重量%、10重量%となるような量で加えた。

次に得られた各ヒドロコチゾン含有アテロコラーゲン溶液をステンレスパットに注入し、-20℃まで急速凍結させて十分凍結した後に、

のアテロコラーゲン溶液を高速で攪拌しながら、1重量/容量%のウロガストロン水溶液をゆっくり滴下して、さらに10分間程攪拌した。このウロガストロン溶液は、ウロガストロンの最終的含有比が各々0.25、2.5及び10重量%となるような量で加えた。

次に得られた各ウロガストロン含有アテロコラーゲン溶液を実施例1と同様に凍結乾燥したところ、ウロガストロン含有のコラーゲンスポンジが得られた。

実施例 4

実施例1~3で得られたスポンジ状の各生成物を50ミリTorr未満の真空下で1時間真空にし、次に110℃にまで温度を上げ24時間以上真空に保ち、その後、室温にまで温度を下げ、細胞増殖因子含有のコラーゲンスポンジの熱脱水架橋したものを得た。

(以下余白)

実施例 5

細胞増殖含有コラーゲンマトリックスの細胞親和性

上記実施例1～3に従って製造した各々のスポンジ状の細胞増殖因子含有コラーゲンの細胞親和性をラットの線維芽細胞を用いて試験した。

60mmの滅菌シャーレ（テルモ株式会社製）に直径3.5cm片のコラーゲンスポンジを置き、線維芽細胞 1×10^6 cells / ml をこのスポンジ上に滴下し、37℃において24時間培養した。その後さらにFBSを含むDME培地を3ml入れて37℃において6日間培養した。

培養終了後にコラーゲンスポンジを10%の中性緩衝ホルマリン液に没し、線維芽細胞を固定して細胞親和性の評価を表1に示した。細胞の侵入・増殖性を「細胞活動性」、細胞によるコラーゲンスポンジの結合組織様変化を「組織の再構築」として評価した。

（以下余白）

表1より明らかなように、コラーゲンマトリックスの細胞親和性は、細胞増殖因子の含有比が0.25～2.5重量%の場合に優れていた。

〔発明の効果〕

本発明は、コラーゲンからなるマトリックス中に一定の範囲の量の細胞増殖因子を含有するコラーゲンマトリックスよりなり、人工皮膚等の医用材料や細胞増殖用の培地として有用である。

本発明のコラーゲンマトリックスにおいて、アテロコラーゲンを使用する場合は、抗原性がなく生体組織への親和性に優れている。

また、細胞増殖因子をマトリックス中に含有するため、その効果が持続され、培養系中に度々追加する必要もなく、好適に細胞の増殖因子を促進し、早期の肉芽形成、表皮形成ひいては治療促進を図ることができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、細胞増殖因子添加量と培養された細胞数との関係を示すグラフである。

表 1

線維芽細胞による細胞増殖因子含有のコラーゲンマトリックスの細胞親和性

	試料	【アテロコラーゲン】 【細胞増殖因子】	細胞親和性*	
			細胞活動性	組織の再構築
実施例1	アテロコラーゲン・ハイドロコラーゲン	99.75 / 0.25	+	+
	アテロコラーゲン・ハイドロコラーゲン	97.5 / 2.5	++	++
	アテロコラーゲン・ハイドロコラーゲン	95 / 5	+	+
比較例1	アテロコラーゲン・ハイドロコラーゲン	90 / 10	-	-
	アテロコラーゲン・インシュリン	99.75 / 0.25	+	+
	アテロコラーゲン・インシュリン	97.5 / 2.5	++	++
実施例2	アテロコラーゲン・クロロガストロン	99.75 / 0.25	++	++
	アテロコラーゲン・クロロガストロン	97.5 / 2.5	++	++
	アテロコラーゲン・クロロガストロン	90 / 10	-	-

* - : 不良 + : やや良好 ++ : 非常に良好 ++ : きわめて良好

第 1 図

